DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.013
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000


论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0129-03

# 哮喘患者外周血淋巴细胞 IL-5、IL-3、GM-CSF mRNA 表达

王长征,王春霞,金远林,钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要 目的:探讨哮喘患者外周血单个核细胞(PBMC)IL-5、IL-3、GM-CSF mRNA 表达以及与慢性支气管炎患者的差异。方法:选哮喘患者13例(哮喘组),平均年龄(31.8±8.5)岁。慢性支气管炎患者9例(慢支组),平均年龄(64.8±4.7)岁。健康献血员9例(对照组),平均年龄(32.8±5.2)岁。抽取静脉血分离单个核细胞,用斑点印迹杂交法检测 IL-5、GM-CSF 和 IL-3 mRNA 的表达。结果:哮喘组 PBMC IL-5、GM-CSF 和 IL-3 mRNA 表达的相对含量明显高于慢支组和对照组($P<0.01$),慢支组与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。结论:哮喘 IL-5、GM-CSF 和 IL-3 mRNA 表达明显增高,可能在哮喘发病中起重要作用。

关键词 哮喘;慢性支气管炎;细胞因子
中图法分类号 R331.144;R562.25 文献标识码 A

# Expression of IL-5, IL-3 and GM-CSF mRNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with asthma

WANG Chang-zheng, WANG Chun-xia, JIN Yuan-lin, QIAN Gui-sheng (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

**Abstract** Objective: To determine the differences of IL-5, IL-3 and GM-CSF mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) between the patients with asthma and those with chronic bronchitis. Methods: The PBMCs were purified from the venous blood of 13 patients with asthma, 9 with chronic bronchitis and 9 healthy individuals. Then the expression of IL-5, IL-3 and GM-CSF mRNA was determined with dot hybridization. Results: The level of IL-5, IL-3 and GM-CSF mRNA expression was significantly higher in patients with asthma than in those with chronic bronchitis and healthy individuals ($P<0.01$). However, there was no marked difference between the patients with chronic bronchitis and healthy individuals. Conclusion: The pathogenic mechanism of asthma is different from that of chronic bronchitis. IL-5, IL-3 and GM-CSF might contribute to the pathogenesis of asthma.

**Key words** asthma; chronic bronchitis; cytokine

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,嗜酸性粒细胞(Eosinophil, Eos)是关键的效应细胞。Eos 通过释放碱性颗粒蛋白及炎性介质损伤气道上皮,导致气道高反应性[1]。而淋巴细胞则在哮喘发病中起关键的调控作用。T细胞被过敏原活化后,释放 IL-5、IL-3 和 GM-CSF 等前炎症细胞因子调控哮喘气道炎症的发生和发展。IL-5、IL-3 和 GM-SF 能促进 Eos 在骨髓的分化、成熟,使机体的 Eos 产生增多,延长 Eos 的存活时间,并促使 Eos 在支气管肺组织的聚集和活化。慢性支气管炎患者的气道组织也存在慢性非特异性炎症。但慢性支气管炎和哮喘气道炎症的差异并未完全阐明。本文通过对哮喘和慢性支气管炎患者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)IL-5、IL-3 和 GM-CSF mRNA 表达水平的研究,探讨其在哮喘发病中的作用以及与慢性支气管炎的差异。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

1.1.1 哮喘组 我院门诊及住院哮喘患者13例,男8例,女

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39470326)
作者简介:王长征(1956.9),男,河南省内黄县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事支气管哮喘发病机制及临床防治方面的研究,发表论文40余篇。电话:(023)68755114 74603
收稿日期:1999-06-21;修回日期:1999-12-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5 例, 平均年龄 (31.8±8.5)岁 (19~44 岁)。均符合支气管哮喘的诊断标准[2]。其中发作期 8 例, 缓解期 5 例, 1 周内均未使用过全身激素治疗。

1.1.2 慢性支气管炎组 (简称慢支组) 我院住院治疗的慢性支气管炎患者 9 例, 男 7 例, 女 2 例, 平均年龄(64.8±4.7)岁(60~75 岁)。经肺功能检查均有显著的气道阻塞, FEV1<预计值的 60%, 1 周内未用过激素治疗。

1.1.3 健康对照组 (对照组) 健康献血员 9 例, 男 5 例, 女 4 例, 平均年龄 (32.8±5.2)岁 (24~42 岁)。均无过敏性疾病及寄生虫感染。

### 1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞的分离 抽取受试者外周静脉血 5 ml, 肝素抗凝。用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC。

1.2.2 PBMC 总 RNA 的提取 取 1 ml(细胞浓度 $10^6$/ ml) PBMC 用异硫氰酸胍法提取。

### 1.3 斑点印迹杂交

1.3.1 材料 ①质粒: 含鼠 IL-5 cDNA 的质粒 pSP6K-mTRF23 由 Akira Tominaga 教授惠赠。含人 IL-3 cDNA 的质粒由黎伯铨博士惠赠, 构建于 pXM。含 GM-CSF cDNA 的 pEMBL8 质粒由 Metcalf 教授惠赠。②IL-5、IL-3、GM-CSF cDNA 探针的制备及标记: 质粒经转化、扩增、碱变性提取, 限制性内切酶 *BamH* Ⅰ分别酶切含 mIL-5 和 mGM-CSF cDNA 的质粒 pSP6K-mTRF23 和 pEMBL8, 用 *XHol* Ⅰ酶切含 hIL-3 的质粒 pXM 后。电洗脱回收目的片段。行 $^{32}$P 随机引物标记, 标记方法按 Promega 公司的随机引物标记试剂盒说明进行。液体闪烁计数器测量计数均达 $10^7$/ min。③杂交及检测杂交主要步骤: 点膜, 80 ℃烤膜 2 h, 65 ℃预杂交 20 h, 65 ℃杂交 16 h, 洗膜及放射自显影。薄层扫描仪扫描, 以同源的 cDNA 为标准品参照, 计算 IL-5、IL-3 和 GM-CSF mRNA 相对含量。

## 2 结果

### 2.1 mIL-5、mGM-CSF、hIL-3 cDNA 酶切片段的鉴定

2.1.1 mIL-5 cDNA 酶切片段的鉴定 提取的质粒 pSP6K-mTRF23 用限制性内切酶 *BamH*Ⅰ酶切, 用 1.0%琼脂糖凝胶分离该片段, 由 λDNA/ *Hind* Ⅲ Marker 标定, 纯化后获得约 1 553 bp 的鼠 IL-5 cDNA 片段。

2.1.2 hIL-3 cDNA 酶切片段鉴定 含 hIL-3 cDNA 片段的质粒用限制性内切酶 *Xho*Ⅰ酶切, 琼脂糖分离后, 由 λDNA/ *Hind* Ⅲ Marker 标定, 纯化后获约 670 bp 的人 IL-3 cDNA 片段。

2.1.3 mGM-CSF 酶切片段鉴定 含 mGM-CSF cDNA 片段的质粒用限制性内切酶 *BamH*Ⅰ酶切, 琼脂糖分离后, 由 λDNA/ *Hind* Ⅲ Marker 标定, 纯化后获约 550 bp 的鼠 GM-CSF cDNA 片段。

### 2.2 PBMC IL-5、IL-3、GM-CSF mRNA 表达的相对含量

哮喘组明显高于慢支组和对照组 ($P<0.01$), 慢支组与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。结果见表 1。

**表 1 PBMC IL-5、IL-3、GM-CSF mRNA 表达相对含量(pg/$10^6$)**

**Tab 1 The relative content of IL-5、IL-3、GM-CSF mRNA expression(pg/$10^6$)**

| Groups | IL-5 mRNA | IL-3 mRNA | GM-CSF mRNA |
|---|---|---|---|
| Control($n=9$) | 35.4±19.5 | 22.7±15.8 | 29.2±18.8 |
| COPD($n=9$) | 39.8±20.1 | 33.2±19.5 | 30.4±16.1 |
| Asthma($n=13$) | 95.3±31.9△ | 121.3±42.2△ | 47.9±18.6△ |

△: $P<0.01$ *vs* control and COPD

## 3 讨论

支气管肺组织内有大量的 Eos 浸润是哮喘的重要病理特征。细胞因子 IL-5、GM-CSF 和 IL-3 能促进体内 Eos 在骨髓的分化成熟, 其中 IL-5 的作用最为重要。IL-5 主要作用于 Eos, 是调控哮喘 Eos 性气道炎症的关键因素。Eos 是哮喘气道炎症产生的关键效应细胞, 它通过释放大量的碱性蛋白及白三烯等炎症介质参与哮喘发病。GM-CSF 和 IL-3 除作用于 Eos 外, 还作用于嗜碱细胞(肥大细胞)、中性粒细胞、巨噬细胞等, 促进它们的分化、成熟。许多研究证明 GM-CSF 也与哮喘肺内的 Eos 增多及气道高反应性关系密切。然而, IL-3 在哮喘发病中的作用仍有争议。在过敏性鼻炎患者的鼻粘膜内, 发现有 IL-3 mRNA 阳性细胞明显增多, 且与活化的 $EG_2$ 阳性 Eos 数呈显著正相关, 从而提示 IL-3 可能与 Eos 增多、活化有关[3]。但也有人发现哮喘患者支气管粘膜活检组织中虽有 IL-3 蛋白的阳性反应, 但 IL-3 阳性反应似乎与粘膜组织中的 Eos 浸润无关[4]。本文结果表明哮喘患者 PBMC 表达的 IL-5、GM-CSF 和 IL-3 均明显增高, 也证实了这 3 种前炎症细胞因子在哮喘病人中存在高表达。但 IL-3 在哮喘发病机制中的作用仍有待进一步的确定。

慢性支气管炎为慢性阻塞性肺疾患, 也可表现为喘息等症状, 和哮喘有一定的相似性。但其发病机制以及与哮喘的差异尚未完全阐明。文献报道哮喘支气管肺组织内以 Eos、肥大细胞、淋巴细胞浸润为主。而慢性支气管炎则以中性粒细胞浸润为主[5,6]。两者体内细胞因子的增多也有差异。哮喘患者是以 IL-5、IL-4、GM-CSF 等细胞因子水平升高为主。而慢性支气管炎患者以则以 IL-8、TNF-α 等升高为主[7]。本研究发现哮喘 PBMC IL-5、GM-CSF 和 IL-3 mRNA 表达显著高于慢性支气管炎患者。由于哮喘和慢性支气管炎患者肺内细胞因子表达的差异, 也决定了哮喘与慢性支气管炎炎性细胞浸润的差异和气道炎症发生机制的差异。

## 参考文献

[1] 王长征. 嗜酸细胞与支气管哮喘[J]. 中华结核和呼吸杂

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

志, 1998, 21(9): 562－564.
[2] 中华医学会呼吸专业委员会. 支气管哮喘的防治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(5): 261－267.
[3] Daniel L H, Donald Y M I, Wood R, *et al*. Chronic hyperplastic sinusitis: Association of tissue eosinophilia with mRNA expression of GM-CSF and IL-3[J]. J Allergy Clin Immunol, 1993, 92(1): 39－48.
[4] Coolley K L, Adelroth E, Woolley M J, *et al*. Interleukin-3 in bronchial biopsies from nonasthmatics and patients with mild and allergen-induced asthma[J]. J Respir Crit Care Med, 1996, 153(1): 350－355.
[5] Peleman R A, Rytila P H, Kips J C, *et al*. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 1999, 13(4): 839－843.
[6] Pesci A, Balbi B, Majori M, *et al*. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 1998, 12(2): 380－386.
[7] Keatings V M, Collins P D, Scott D M, *et al*. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(2): 530－534.

（编辑 冯崇英）

## 经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)02-0131-02

# 立体定向放射治疗 15 例晚期及复发直肠癌的近期疗效观察

# Preliminary study of the treatment effect of stereotactic radiotherapy on 15 cases of advanced and recurrent carcinoma of rectum

庞学利, 肖 红, 谭崇富, 王 希, 钟元培 （第三军医大学附属西南医院肿瘤科, 重庆 400038）

晚期和复发直肠癌是临床上常见而治疗十分棘手的问题。我们自 1997 年 9 月至 1998 年 8 月采用立体定向放射治疗技术(Stereotactic radiotherapy, SRT), 治疗晚期和术后盆腔复发的直肠癌 15 例, 取得了较好近期疗效, 现将初步经验报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

患者 15 例, 男性 12 例, 女性 3 例。年龄 33～71 岁, 平均年龄 53 岁。其中局部晚期直肠癌 4 例, 因年老体弱(均大于 66 岁)及合并有严重心肺疾患等而不适宜手术治疗。术后复发 11 例, 其中根治术后盆腔复发 8 例, 手术＋放疗后复发 3 例。手术至复发的间隔时间 3 月至 5 年, 平均 1.6 年。初程放疗剂量 60 Gy 2 例, 50 Gy 1 例, 均为高能 X 线全盆腔照射, 放疗结束至复发间隔时间 3～10 月, 平均 6 月。所有病例均经活检或手术病理证实, 除 1 例为肉瘤外均为腺癌。治疗前均从临床检查及 CT 等影像学资料证实复发。晚期直肠癌的主要症状表现为肛门坠胀、排便困难及血便。复发患者的突出症状为会阴和/或骶部坠胀、疼痛, 其中 6 例为剧痛, 4 例合并有膀胱刺激症状, 2 例有血尿, 2 例伴下肢水肿, 1 例有远处淋巴结转移。CT 显示肿瘤长径 4.0～7.5 cm, 平均 5.5 cm, 有 4 例肿瘤侵犯膀胱后壁。患者 Karnofsky 评分均大于 70。

作者简介: 庞学利(1963. 1), 男, 山西省介休市人, 硕士; 副主任医师, 副教授, 主要从事肿瘤放射治疗方面的研究, 发表论文 15 篇。电话: (023)68754184

收稿日期: 1998-11-02; 修回日期: 1998-12-09

### 1.2 治疗方法

采用大恒 Star-1000 型立体定向放射治疗系统进行治疗。患者均取俯卧位于体部定位框架内, 真空固定袋固定, CT 连续扫描定位, 扫描层厚均为 10 mm。CT 图象经磁带传输至计算机工作站进行三维重建和治疗计划设计。采用直径≤50 mm 之限光筒旋转聚焦照射, 其中单靶点照射 6 例, 多靶点照射 9 例。隔日照射一次, 每次剂量 5～8 Gy, 靶区处方总剂量 25～40 Gy, 平均 32 Gy。靶区边缘剂量为处方剂量的 50%～80%, 大多为 50%～60%。1 例晚期直肠癌患者 SRT 后行全盆腔照射 40 Gy; 2 例术后复发患者 SRT 前先行全盆腔放射 40 Gy。

### 1.3 疗效评价

近期疗效评价以临床症状和体征改善为主要依据。

## 2 结果

SRT 治疗后 4 例晚期直肠癌患者血便全部消失, 肛门坠胀 3 例缓解, 1 例稍减轻; 排便困难 2 例显著缓解, 2 例有所改善。11 例复发患者中, 会阴及骶部坠胀、剧烈疼痛完全缓解或基本完全缓解 6 例、其中缓解 6 个月以上 3 例、3 个月以上 3 例, 最长 1 例达 11 月。疼痛减轻(止痛药用量减少一半以上) 4 例; 2 例肉眼血尿消失, 膀胱刺激症状 2 例缓解。4 例晚期直肠癌患者 SRT 后分别已随访 3～7 月, 病情均稳定。11 例复发患者已随访 3～11 月, 其中 2 例于治疗后 4 月, 1 例于治疗后 8 月死于局部复发或远处转移。2 例术后放疗后复发患者分别于 SRT 后 1 月和 8 月出现会阴部及大腿内侧感觉麻木。1 例术后复发患者 SRT 14 Gy 照射 2 次后出现下腹绞痛, 经临床药物治疗后缓

（下转 134 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net